

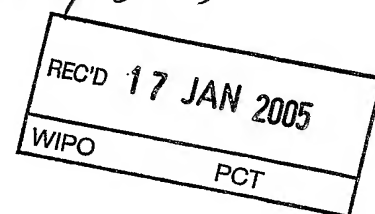
01.12.2004

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP 04/13663

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 59 352.7

Anmeldetag: 16. Dezember 2003

Anmelder/Inhaber: Merck Patent GmbH,
64293 Darmstadt/DE

Bezeichnung: DNA-Sequenz und rekombinante
Herstellung des Graspollen-Allergens
Lol p 4

IPC: C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. September 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des
Graspollen-Allergens Lol p 4.**

DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des Graspollen-Allergens Lol p 4

5

Hintergrund der Erfindung

10

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung einer DNA-Sequenz des Graspollenhauptallergens Lol p 4. Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *In-vitro*- und *In-vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

15

20

Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 20 % der Bevölkerung in industrialisierten Ländern leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma. Diese Allergien werden durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene), die von Quellen unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen oder Hunden freigesetzt werden, hervorgerufen. Bis zu 40 % dieser Typ 1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE-Reaktivität mit Gräserpollenallergenen (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2001).

25

30

35

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur Ausschüt-

- 2 -

tung von Mediatoren (z. B. Histamin, Prostaglandine) und Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

5

In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit mit der die einzelnen Allergenmoleküle mit den IgE-Antikörpern von Allergikern reagieren, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden.

10

Für das Weidelgras (*Lolium perenne*) wurde das Lol p 1 als ein Hauptallergen identifiziert (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. 78:1190-1201) und seine Primärstruktur aufgeklärt (Perez et al., 1990, J. Biol. Chem.

15

265:16210-16215). Ein weiteres Hauptallergen ist das Lol p 2 (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. 78:1190-1201) dessen Primärstruktur 1993 beschrieben wurde (Ansari et al., 1989, J. Biol. Chem.: 264:11181-11185).

20

Ein weiteres Hauptallergen des Weidelgrases ist das Lol p 5 (Mattiesen und Löwenstein 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307). Die Primärstruktur von Lol p 5 ist ebenfalls bekannt (Ong et al., 1993, Gene 134:235-240).

Das Weidelgras enthält weiterhin die Hauptallergene der Gruppen 4 (Fahlbusch et al. 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807) und 13 (Petersen et al., 2001, J. Allergy Clin. Imm. 107:856-862).

25

Das Lol p 4 ist ein typisches basisches Glykoprotein (Jaggi et al, 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:342-348, Jaggi et al., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83:845-852) und hinsichtlich der Kreuzreaktivität mit spez. IgE-

30

Antikörpern mit dem gut untersuchten Phl p 4, Cyn d 4 und Dac g 4 zu vergleichen (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78:260-268; Su et al., 1991, Clin. Exp. Allergy 21:449-455; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:1065-1072; 14-17).

35

Diese homologen Moleküle der *Poaceae* bilden die Allergengruppe 4, deren Moleküle eine hohe immunologische Kreuzreaktivität untereinander sowohl mit monoklonalen Mausantikörpern als auch mit humanen IgE-

Antikörpern aufweisen (Fahlbusch et al., 1993 Clin. Exp. Allergy 23:51-60; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:1065-1072; Su et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97:210; Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrovic-Jankulovic et al., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 (6):361-367; Stumvoll et al. 2002, Biol. Chem. 383:1383-1396; Grote et al., 2002, Biol. Chem. 383:1441-1445; Andersson und Lidholm, 2003, Int. Arch. Allergy Immunol. 130:87-107; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy, 33 (1):43-51).

10

Im Gegensatz zu den obengenannten Hauptallergenen Lol p 1, Lol p 2, Lol p 5 von *Lolium perenne* ist die Primärstruktur von Lol p 4 noch nicht aufgeklärt.

15

Von dem Gruppe-4 Allergen aus *Dactylus glomerata* sind bisher lediglich Peptide durch enzymatischen Abbau gewonnen und sequenziert worden: DIYNYMEPYVSK,

20

VDPTDYFGNEQ,

ARTAWVDSGAQLGELSY

und GVLFNIQYVNYWFAP (Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072).

25

Auch vom Gruppe-4 Allergen des subtropischen Bermuda-Grases (*Cynodon dactylon*) sind durch Proteolyse Peptide erhalten und sequenziert worden:

KTVKPLYIITP,

KQVERDFLTSLTKDIPQLYLKS,

30

TVKPLYIITPITAAMI,

LRKYGTAADNVIDAKVVDAQGRLL,

KWQTVAPALPDPNM,

VTWIESVPYIPMGDK,

GTVRDLLXRTSNIKAFGKY,

35

TSNIKAFGKYKSDYVLEPIPKKS,

- 4 -

YRDLDLGVNQVVG,
SATPPTHRSGVLFNI,
und AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDLD (Liaw et al.,
2001, Biochem. Biophys. Research Communication 280: 738-743).

5

Für *Lolium perenne* wurden für das basische Gruppe-4 Allergen Peptid-
fragmente mit den folgenden Sequenzen beschrieben: FLEPVLGLIFPAGV
und GLIEFPAGV (Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:
342-348).

10

Diese beschriebenen Peptidsequenzen für *Lolium perenne* und andere
Gruppe-4 Allergene haben jedoch bisher nicht zur Aufklärung der Primär-
struktur des Lol p 4 Allergens geführt.

15

Als erste Sequenz eines Allergens der Gruppe 4 wurde von den Erfindern
der vorliegenden Patentanmeldung die noch unveröffentlichte Sequenz des
Phl p 4 aus *Phleum pratense* aufgeklärt und in der internationalen Anmel-
dung PCT/EP03/06092 beschrieben.

20

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand daher
in der Bereitstellung einer DNA-Sequenz des Lol p 4-Gens, kodierend für
ein Allergen mit den immunologischen Eigenschaften des Lol p 4, sowie ei-
ner entsprechenden rekombinanten DNA, auf deren Grundlage das Aller-
gen als Protein exprimiert und einer pharmakologisch bedeutsamen Ver-
wertung als solches oder in veränderter Form zugänglich gemacht werden
kann. Die Sequenz des Phl p 4 war Ausgangspunkt für die vorliegende Er-
findung.

25

30

35

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: DNA-Sequenz aus dem Lol p 4-Gen.

5

Abbildung 2: Aus der DNA-Sequenz gemäß Abb. 1 abgeleitete Protein-Sequenz.

10

Abbildung 3: DNA-Sequenz, zusammengesetzt aus den Nukleotiden 1-200 des Phl p 4 (gemäß Abb. 5), 201-1472 des Lol p 4 sowie 1473-1503 des Phl p 4 (gemäß Abb. 5). Die aus Phl p 4 stammenden Komponenten sind in kleinen, die aus Lol p 4 stammenden Komponenten in großen Buchstaben dargestellt.

15

Abbildung 4: Proteinsequenz, zusammengesetzt aus den Aminosäuren 1-67 des Phl p 4 (gemäß Abb. 6), 68-490 des Lol p 4 sowie 491-500 des Phl p 4 (gemäß Abb. 6) mit den Eigenschaften, insbesondere immunologischen Eigenschaften des Lol p 4, kodiert von der DNA-Sequenz gemäß Abb. 3. Die aus Phl p 4 stammenden Komponenten sind in kleinen, die aus Lol p 4 stammenden Komponenten in großen Buchstaben dargestellt.

20

25

Abbildung 5: DNA-Sequenz des Phl p 4, gemäß SEQ ID NO 5 aus der PCT/EP03/06092.

Abbildung 6: Proteinsequenz des Phl p 4, gemäß SEQ ID NO 6 aus der PCT/EP03/06092.

30

35

Beschreibung der Erfindung

5 Mit der vorliegenden Erfindung wird nun erstmals eine DNA-Sequenz des Graspollenhauptallergens Lol p 4 bereit gestellt (Abb. 1), die für ein Allergen mit den immunologischen Eigenschaften des Lol p 4 kodiert.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß Abb. 1.

10 Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß Abb. 3, zusammengesetzt aus den Nukleotiden 1-201 des Phl p 4 (gemäß Abb. 5), 202-1470 des Lol p 4 (Abb. 1) sowie 1471-1500 des Phl p 4.

15 Die Erfindung betrifft weiterhin zu den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen homologe Sequenzen bzw. entsprechende DNA-Moleküle von Gruppe-4-Allergenen aus anderen *Poaceae* wie beispielsweise *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare*, die aufgrund der bestehenden
20 Sequenzhomologie mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren, bzw. bezüglich Lol p 4 eine immunologische Kreuzreaktivität aufweisen.

25 Die Erfindung schließt dabei auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein.

30 Gegenstand der Erfindung sind daher weiterhin entsprechende Teilsequenzen, einer Kombination von Teilsequenzen bzw. Austausch-, Elimierungs- oder Additionsmutanten, welche für ein immunmodulatorisches, T-Zell-reaktives Fragment eines Gruppe-4-Allergens der *Poaceae* kodieren.

35 Mit der Kenntnis der DNA-Sequenz der natürlich vorkommenden Allergene ist es nun möglich, diese Allergene als rekombinante Proteine herzustellen,

die in der Diagnostik und Therapie von allergischen Erkrankungen Verwendung finden können (Scheiner and Kraft, 1995, Allergy 50: 384-391).

- 5 Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6): 336-339, Bousquet et al., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 102(4): 558-562). Dabei werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht
- 10 bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar eines anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren, werden innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Vergleich zum nicht be-
- 15 handelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7): 377-382). Eine noch weitergehende Therapieoptimierung wäre mit rekombinant hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggfs. auf die individuellen Sensibilisierungsmuster der Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen, rekombinant hergestellten Allergenen könnten Extrakte aus natürlichen Al-
- 20 lergenquellen ablösen, da diese außer den verschiedenen Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen enthalten.
- 25 Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit Expressionsprodukten führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante Allergene, bei denen IgE-Epitope spezifisch deletiert werden, ohne die für die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schramm et
- 30 al., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

- 35 Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung des gestörten TH-Zell-Gleichgewichtes bei Allergikern ist die immuntherapeutische DNA-Vakzinierung. Dabei handelt es sich um eine Behandlung mit expressionsfähiger DNA, die für die relevanten Allergene kodiert. Erste experimentelle Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort konnte

an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht werden (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül bzw. ein entsprechender rekombinanter Expressionsvektor als Arzneimittel.

10 Die entsprechenden rekombinant hergestellten Proteine können zur Therapie sowie zur *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

Zur Herstellung des rekombinanten Allergens wird die klonierte Nukleinsäure in einen Expressionsvektor ligiert und dieses Konstrukt in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimiert. Nach biochemischer Reinigung steht
15 dieses rekombinante Allergen zur Detektion von IgE-Antikörpern in etablierten Verfahren zur Verfügung.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz und ein Wirtsorganismus, transformiert mit besagtem DNA-Molekül oder besagtem Expressionsvektor.

25 Ebenfalls erfindungsgegenständlich ist die Verwendung mindestens eines zuvor beschriebenen DNA-Moleküls oder mindestens eines zuvor beschriebenen Expressionsvektors zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an
30 deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, insbesondere Lol p 4, beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

35 Wie bereits ausgeführt kann die Erfindung als eine essentielle Komponente in einem rekombinanten allergen- oder nukleinsäurehaltigen Präparat zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden. Hierbei bieten sich meh-

5 rere Möglichkeiten. Zum einen kann das in der Primärstruktur unveränderte Protein Bestandteil des Präparates sein. Zum anderen kann durch gezielte Deletion von IgE-Epitopen des Gesamtmoleküls oder der Herstellung von einzelnen Fragmenten, die für T-Zell Epitope kodieren, erfindungsgemäß eine hypoallergene (allergoide) Form zur Therapie verwendet werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Schließlich wird durch die Nukleinsäure an sich, wenn sie mit einem eukaryontischen Expressionsvektor ligiert wird, ein Präparat geschaffen, das direkt appliziert den allergischen Immunzustand im therapeutischen Sinne verändert.

15 Desweiteren handelt es sich bei der vorliegenden Erfindung um die von einem oder mehreren der zuvor beschriebenen DNA-Moleküle kodierten Polypeptide, vorzugsweise in ihrer Eigenschaft als Arzneimittel. Insbesondere handelt es sich bei den Polypeptiden um ein Protein entsprechend einer Aminosäuresequenz gemäß Abb. 2 bzw. eines Proteins, welches diese Aminosäuresequenz oder einen Teil dieser Sequenz enthält, mit den Eigenschaften, insbesondere immunologischen Eigenschaften des Lol p 4 sowie um ein Protein entsprechend einer Aminosäuresequenz gemäß Abb. 4 mit den Eigenschaften, insbesondere immunologischen Eigenschaften des Lol p 4.

25 Die Erfindung betrifft demgemäß auch ein Verfahren zur Herstellung solcher Polypeptide durch Kultivieren eines Wirtsorganismus und Gewinnung des entsprechenden Polypeptides aus der Kultur.

30 Ebenfalls erfindungsgegenständlich ist die Verwendung mindestens eines zuvor beschriebenen Polypeptides bzw. Proteins zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, insbesondere Lol p 4, beteiligt sind sowie zur Prävention solcher Allergien.

35

Bei der Ermittlung der Protein- und DNA-Sequenz des Lol p 4 wurde wie folgt vorgegangen:

5 Die erfindungsgemäße Lol p 4-DNA-Sequenz gemäß Abb. 1 wurde durch PCR mit spezifischen Primern (Tab. 1), die von der Phl p 4 Sequenz, wie in der PCT/EP03/06092 beschrieben, abgeleitet wurden, amplifiziert, kloniert und sequenziert. Insgesamt wurden 7 Klone analysiert. Die Analyse der Klone ergab eine einheitliche Sequenz. Drei Lol p 4-DNA-Sequenzen wurden durch PCR mit den Primern #87 und #83 erhalten. Die mit diesen Primern amplifizierte Lol p 4-DNA-Sequenz kodiert für die korrespondierenden Aminosäuren 68-401, bezogen auf die Nummerierung des reifen Phl p 4 (Abb. 6). Zwei weitere Klone wurden durch PCR mit den Primern #87 und #189 erhalten. Die mit diesen Primern amplifizierte Lol p 4-DNA-Sequenz kodiert für die korrespondierenden Aminosäuren 68-490 (Nummerierung entsprechend Phl p 4-Sequenz). Zwei Klone wurden durch PCR mit den Primern #87 und #131 erhalten. Die amplifizierte Lol p 4-DNA-Sequenz kodiert ebenfalls für die korrespondierenden Aminosäuren 68-490 (Nummerierung entsprechend Phl p 4-Sequenz). Die Primer #131 und #189 entsprechen den Codons für die letzten 10 Aminosäuren des Phl p 4 Proteins und überspannen das Stoppcodon.

25 Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz gemäß Abb. 3 wurde nach an sich bekannten Methoden erhalten (PCR-Technik mit überlappenden Primern).

30 Zur Herstellung der rekombinanten erfindungsgemäßen Allergene wurden die DNA-Sequenzen gemäß Abb. 1 bzw. 3 in Expressionsvektoren (z.B. pProEx, pSE 380) eingebaut. Für die aus der Proteinsequenzierung bekannten N-terminalen Aminosäuren wurden *E. coli* optimierte Codons verwendet.

35 Nach der Transformation in *E. coli*, der Expression und der Reinigung der rekombinanten erfindungsgemäßen Allergene durch verschiedene Trenn-

techniken wurde die erhaltenen Proteine einem Refoldingprozess unterworfen.

5 Beide Allergene können zur hochspezifischen Diagnostik von Graspollenallergien eingesetzt werden. Diese Diagnostik kann *in vitro* durch die Detektion von spezifischen Antikörpern (IgE, IgG1 - 4, IgA) und die Reaktion mit IgE-beladenen Effektorzellen (z. B. Basophile aus dem Blut) oder *in vivo* durch Hauttest-Reaktionen und Provokation am Reaktionsorgan erfolgen.

10 Die Reaktion der erfindungsgemäßen Allergene mit T-Lymphozyten von Graspollenallergikern können durch die allergenspezifische Stimulierung der T-Lymphozyten zur Proliferation und Zytokinsynthese sowohl mit T-Zellen in frisch präparierten Blutlymphozyten als auch an etablierten nLol p
15 4-reaktiven T-Zell-Linien und -Klonen nachgewiesen werden.

Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden die für die Cysteine kodierenden Triplets so verändert, dass sie für andere Aminosäuren, bevorzugt Serin, kodieren. Es wurden sowohl Varianten hergestellt, bei denen einzelne
20 Cysteine ausgetauscht wurden, als auch solche, bei denen verschiedene Kombinationen von 2 Cysteinresten bzw. alle Cysteine verändert wurden. Die exprimierten Proteine dieser Cysteinpunktmutanten weisen eine stark reduzierte bzw. fehlende Reaktivität mit IgE-Antikörpern von Allergikern
25 auf, reagieren jedoch mit den T-Lymphozythen dieser Patienten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, bei dem durch ortsgerichtete
30 Mutagenese einer, mehrere oder alle Cystein-Reste des entsprechenden Polypeptids gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurden.

Die immunmodulatorische Aktivität von hypoallergenischen Fragmenten, die Polypeptiden mit T-Zell-Epitopen entsprechen, sowie die der hypoallergenischen Punktmutanten (z.B. Cystein-Austausche) kann durch ihre Reaktion
35 mit T-Zellen von Graspollenallergikern nachgewiesen werden.

5 Solche hypoallergenischen Fragmente bzw. Punktmutanten der Cysteine können als Präparate zur Hyposensibilisierung von Allergikern eingesetzt werden, da sie mit gleicher Effektivität mit den T-Zellen reagieren, jedoch aufgrund der verminderten oder ganz fehlenden IgE-Reaktivität zu geringeren IgE-vermittelten Nebenwirkungen führen.

10 Werden die für die erfindungsgemäßen hypoallergenischen Allergen-Varianten kodierenden Nukleinsäuren oder die unveränderten erfindungsgemäßen DNA-Moleküle mit einem humanen Expressionsvektor ligiert, können diese Konstrukte ebenfalls als Präparate für eine Immuntherapie (DNA-Vakzinierung) angewendet werden.

15 Schließlich sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend mindestens ein zuvor beschriebenes DNA-Molekül oder mindestens einen zuvor beschriebenen Expressionsvektor und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung
20 Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, insbesondere Lol p 4, beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

25 Eine weitere Gruppe von erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen enthält anstelle der DNA mindestens ein zuvor beschriebenes Polypeptid und eignet sich zur Diagnose und/oder Behandlung besagter Allergien.

30 Pharmazeutische Zubereitungen im Sinne der vorliegenden Erfindung enthaltend als Wirkstoffe ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Expressionsvektor und/oder deren jeweilige pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen. Hierbei
35 können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und

gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden.

Als Hilfsstoffe sind immunstimulierende DNA oder Oligonukleotide mit CpG-Motiven besonders geeignet.

5

Diese Zubereitungen können als Therapeutika oder Diagnostika in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die parenterale Applikation eignen und die Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs nicht negativ beeinflussen. Zur parenteralen Anwendung dienen insbesondere Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Der erfindungsgemäße Wirkstoff kann auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen und/oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten.

10

15

20

Weiterhin können durch entsprechende Formulierung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs Depotpräparate - zum Beispiel durch Adsorption an Aluminiumhydroxid - erhalten werden.

25

Die Erfindung dient somit auch zur Verbesserung der *in vitro* Diagnostik im Rahmen einer Allergen-Komponenten auflösenden Identifizierung des patientenspezifischen Sensibilisierungsspektrums. Die Erfindung dient ebenfalls zur Herstellung von deutlich verbesserten Präparaten zur spezifischen Immuntherapie von Gräserpollenallergien.

30

35

Tabelle 1 Verwendete Primer

Primer-nummer	Sequenz
#83	GGCTCCCGGGGCGAACCAGTAG
#87	ACCAACGCCTCCCACATCCAGTC
#131	GATAAGCTTGAATTCTGATTAGTACTTTTTGATCAGCGGCG GGATGCTC
#189	GATAAGCTTCTCGAGTGATTAGTACTTTTTGATCAGCGGCG GGATGCTC

5

10

15

20

25

30

35

Patentansprüche

- 5
1. Ein DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus einer der in den Abbildungen 1 und 3 dargestellten Sequenzen.
 - 10
 2. Ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül gemäß Anspruch 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und von DNA-Sequenzen von *Poaceae*-Spezies abstammt.
 - 15
 3. Ein DNA-Molekül, kodierend für ein Polypeptid, welches mit dem Majorallergen Lol p 4 aus *Lolium perenne* immunologisch kreuzreagiert, und von DNA-Sequenzen von *Poaceae*-Spezies abstammt.
 - 20
 4. Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Teilsequenz oder einer Kombination von Teilsequenzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, welches für ein immunmodulatorisches, T-Zell-reaktives Fragment eines Gruppe-4-*Poaceae*-Allergens kodiert.
 - 25
 5. Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, kodierend für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Nukleotidsequenz durch gezielte Mutation einzelner Codons, Eliminierung oder Addition gezielt verändert wurde.
 - 30
 6. Ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte Mutation zum Austausch eines, mehrerer oder aller Cysteine des entsprechenden Polypeptids gegen eine andere Aminosäure führt.
 - 35
 7. Ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollse-

quenz.

- 5 8. Ein Wirtsorganismus, transformiert mit einem DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 oder einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 7.
- 10 9. Ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, kodiert durch eine DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, durch Kultivieren eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 8 und Gewinnung des entsprechenden Polypeptids aus der Kultur.
- 15 10. Ein Polypeptid, welches von einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wird.
11. Ein Polypeptid gemäß Anspruch 10 als Arzneimittel.
- 20 12. Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Polypeptid gemäß Anspruch 11 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind.
- 25 13. Verwendung mindestens eines Polypeptids gemäß Anspruch 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.
- 30 14. Ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 als Arzneimittel.
- 35 15. Ein rekombinanter Expressionsvektor gemäß Anspruch 7 als Arzneimittel.

- 17 -

5 16. Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 14 oder mindestens einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 15 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

10 17. Verwendung mindestens eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 14 oder mindestens eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

15

20

25

30

35

Zusammenfassung

5

10

15

20

25

30

35

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung einer DNA-Sequenz des Graspollenhauptallergens Lol p 4. Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *In-vitro*- und *In-vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

Abbildungen

5 **Abbildung 1**

5 TGCCGTGGTGTGCGGCCGCGTTACGACGTCCGCATCCGCGTACGCA
10 GCGGCGGGCAGACTACGAGGGCCTCTCGTACCGCTCCCTGCAGCCC
10 GAGAACTTCGCAGTCGTGACCTCAACCAGATGCGGGCGGTGTTGGT
15 GGACGGTAAGGCCCGCACGGCGTGGGTGCGACTCCGGCGCGCAGCTCG
15 GCGAGCTCTACTACGCCATCTCCAAGTATAGCCGCACGCTGGCCTTC
15 CCGGCAGGCGTTTGCCCGACCATCGGCGTGGGCGGCAACCTCGCGGG
15 CGGCGGCTTCGGTATGCTGCTGCGCAAGTACGGCATCGCCGCAGAGA
15 ACGTCATCGACGTGAAGCTCGTCGACGCCAACGGCAAGCTGCACGAC
15 AAGAAGTCCATGGGCGACGACCATTTCTGGGCGGTGAGGGGTGGCGG
15 CGGCGAGAGCTTCGGCATCGTGGTCTCGTGGCAGGTGAAGCTCCTGC
20 CGGTGCCTCCCACGGTGACCATCTTCAAGATCCCCAAGTCAGTCAGC
20 GAGGGCGCCGTGGACATCATCAACAAGTGGCAACTGGTCGCGCCTCA
20 ACTTCCCGCCGACCTCATGATCCGCATCATTGCGATGGGGCCCAAGG
25 CCACGTTCGAGGCCATGTACCTCGGCACCTGCAAAACCCTGACGCCG
25 ATGATGCAGAGCAAGTTCCCCGAGCTTGGCATGAACGCCTCGCACTG
25 CAACGAGATGTCATGGATCGAGTCCATCCCCTTCGTCCACCTCGGCC
25 ATAGGGATTCCCTGGAGGGCGACCTCCTCAACCGGAACAACACCTTC
25 AAGCCCTTTGCGGAGTACAAATCGGACTACGTCTACGAGCCATTCCC
30 CAAGAGCGTGTGGGAGCAGATCTTCGGCACCTGGCTCGTGAAGCCTG
30 GTGCGGGGATTATGATCTTTGACCCCTACGGTGCCACCATCAGCGCT
30 ACCCCAGAAGCGGCGACGCCGTTCCCTCACCGCAAGGGAGTCCTCTT
30 CAACATCCAGTACGTCAACTACTGGTTTCGCTCCGGGAGCCGGCGCCG
35 CGCCCTTGTCATGGAGCAAGGAAATCTACAACCTACATGGAGCCGTAC
35 GTGAGCAAGAACCCAGGCAGGCCTACGCCAACTACAGGGACATCGA

- 20 -

5 CCTCGGGAGGAACGAGGTGGTGAATGGCGTCTCCACCTACAGCAGTG
GTAAGGTCTGGGGACAGAAATATTTCAAGGGTAACTTCGAGAGGCTC
GCCATTACCAAGGGCAAGGTGGATCCTACGGATTACTTCAGGAACGA
GCA

Abbildung 2

10 AVVCGRRYDVRI RVRSGGHDYEGLSYRSLQPENFAVVDLNQMRVLV
DGKARTAWVDSGAQLGELYAISKYSRTLAF PAGVCPTIGVGGNLAG
GGFGMLLRKYGIAAENVIDVKLVDANGKLHDKKSMGDDHFWAVRGGG
15 GESFGIVVSWQVKLLPVPPTVTIFKIPKSVSEGAVDIINKWQLVAPQ
LPADLMIRIIAMGPKATFEAMYLGTCKTLTPMMQSKFPELGMNASHC
NEMSWIESIPFVHLGHRDSLEGDLLNRNNTFKPFAEYKSDYVYEPFP
KSVWEQIFGTWLVKPGAGIMIFDPYGATISATPEAATPFPHRKGVL F
20 NIQYVNYWFAPGAGAAPLSWSKEIYNYMEPYVSKNPRQAYANYRDID
LGRNEVVNGVSTYSSGKVWGQKYFKGNFERLAITKGKVDPTDYFRNE

25 Abbildung 3

tacttccccgccgcccggctgctaaagaagacttcctggggttgccctggt
taaagaaatccccgccgctctgttgtagcgaaatcgtagccggcgct
30 atccctcagtcctggggcagaccatccggaactcgagggtggtagctcg
ccggacaacgtgaagccgctctacatcatcacccccaccaacgtctc
ccacatccagtcTGCCGTGGTGTGCGGCCGCCGTTACGACGTCCGCA
TCCGCGTACGCAGCGGCGGGCACGACTACGAGGGCCTCTCGTACCGC
35 TCCCTGCAGCCCGAGAACTTCGCAGTCGTGACCTCAACCAGATGCG
GGCGGTGTTGGTGGACGGTAAGGCCCGCACGGCGTGGGTGCGACTCCG

- 21 -

5 GCGCGCAGCTCGGCGAGCTCTACTACGCCATCTCCAAGTATAGCCGC
ACGCTGGCCTTCCCGGCAGGCGTTTGCCCGACCATCGGCGTGGGCGG
CAACCTCGCGGGCGGCGGCTTCGGTATGCTGCTGCGCAAGTACGGCA
TCGCCGCAGAGAACGTCATCGACGTGAAGCTCGTCGACGCCAACGGC
AAGCTGCACGACAAGAAGTCCATGGGCGACGACCATTCTGGGCCGT
GAGGGGTGGCGGCGGCGAGAGCTTCGGCATCGTGGTCTCGTGGCAGG
TGAAGCTCCTGCCGGTGCCCTCCACGGTGACCATCTTCAAGATCCCC
10 AAGTCAGTCAGCGAGGGCGCCGTGGACATCATCAACAAGTGGCAACT
GGTCGCGCCTCAACTTCCCGCCGACCTCATGATCCGCATCATTGCGA
TGGGGCCCAAGGCCACGFTCGAGGCCATGTACCTCGGCACCTGCAAA
ACCCTGACGCCGATGATGCAGAGCAAGTTCCCCGAGCTTGGCATGAA
15 CGCCTCGCACTGCAACGAGATGTCATGGATCGAGTCCATCCCCTTCG
TCCACCTCGGCCATAGGGATTCCCTGGAGGGCGACCTCCTCAACCGG
AACAACACCTTCAAGCCCTTTGCGGAGTACAAATCGGACTACGTCTA
CGAGCCATTCCCCAAGAGCGTGTGGGAGCAGATCTTCGGCACCTGGC
20 TCGTGAAGCCTGGTGCAGGGGATTATGATCTTTGACCCCTACGGTGCC
ACCATCAGCGCTACCCCAGAAGCGGCGACGCCGTTCCCTCACCGCAA
GGGAGTCCTCTTCAACATCCAGTACGTCAACTACTGGTTCGCTCCGG
GAGCCGGCGCCGCGCCCTTGTCATGGAGCAAGGAAATCTACAACCTAC
25 ATGGAGCCGTACGTGAGCAAGAACCCAGGCAGGCCTACGCCAACTA
CAGGGACATCGACCTCGGGAGGAACGAGGTGGTGAATGGCGTCTCCA
CCTACAGCAGTGGTAAGGTCTGGGGACAGAAATATTTCAAGGGTAAC
TTTCGAGAGGCTCGCCATTACCAAGGGCAAGGTGGATCCTACGGATTA
30 CTTACAGGAACGAGCAgagcatcccgccgctcatcaaaaagtactga

35

- 22 -

Abbildung 4

5 yfpppaakedflgclvkeipprllyaksspaypsvlgqtirnswss
pdnvkplyiitptnvshiqsAVVCGRRYDVRIRVRSGGHDYEGLSYR
SLQPFENFAVVDLNQMRAVLVDGKARTAWVDSGAQLGELYAISKYSR
TLAFPAGVCPTIGVGGNLAGGGFGMLLRKYGIAAENVIDVKLVDANG
KLHDKKSMGDDHFWAVRGGGGESEFGIVVSWQVKLLPVPPTVTIFKIP
10 KSVSEGAVDIINKWQLVAPQLPADLMIRIIAMGPKATFEAMYLGTCK
TLTPMMQSKFPELGMNASHCNEMSWIESIPFVHLGHRDSLEGDLLNR
NNTFKPFAEYKSDYVYEPFPKSVWEQIFGTWLVKPGAGIMIFDPYGA
TISATPEAATPFPHRKGVLFNIOQVNYWFAPGAGAAPLSWSKEIYNY
15 MEPYVSKNPRQAYANYRDIDLGRNEVVNGVSTYSSGKVGQKYFKGN
FERLAITKGKVDPTDYFRNEqsipp
likky

20

Abbildung 5

25 tacttcccgccgccggctgctaaagaagacttcctggggtgcctggg
taaagaaatcccgccgcgtctgttgtagcggaatcgctgccggcgt
atccctcagtcctggggcagaccatccggaactcgaggtggctcg
ccggacaacgtgaagccgctctacatcatcaccaccaccaacgtctc
ccacatccagtcgccggtggtgtgcgggccgccacagcgctccgca
30 tccgcgtgcgagcgggcgggcacgactacgagggcctctcgtagcgg
tctttgcagcccagagcggttcgcccgtcgtagacctcaacaagatg
ggcggtgtgggtggacggcaaggcccgccagcggtgggtggactccg
gcgcgcagctcggcgagctctactacgccatctataaggcgagcccc
35 acgctggcggttcccggccggcggtgtgcccgcagatcggagtgggcgg
caacttcgcggggcgggcggttcggcatgctgctgcgcaagtacggca

- 23 -

tcgccgcggagaacgtcatcgacgtgaagctcgtcgacgccaacggc
aagctgcacgacaagaagtccatgggcgacgaccatttctgggccgt
caggggcgggcgggggcgagagcttcggcatcgtggtcgcgtggcagg
5 tgaagctcctgccggtgccgcccaccgtgacaatattcaagatctcc
aagacagtgagcgagggcgccgtggacatcatcaacaagtggcaagt
ggtcgcgcccgcagcttcccggcgacctcatgatccgcatcatcgcg
aggggcccgaaggccacgttcgaggccatgtacctcggcacctgcaaa
10 accctgacgccgttgatgagcagcaagttcccggagctcggcatgaa
cccctcccactgcaacgagatgtcatggatccagtccatccccttcg
tccacctcggccacagggacgccctcgaggacgacctcctcaaccgg
aacaactccttcaagcccttcgccgaatacaagtccgactacgtcta
15 ccagcccttccccgaagaccgtctgggagcagatcctcaacacctggc
tcgtcaagcccggcgccgggatcatgatcttcgacccctacggcgcc
accatcagcgccaccccggagtccgccacgcccttccctcaccgcaa
gggcgtcctcttcaacatccagtacgtcaactactggttcgccccgg
20 gagccgcccgcgccccctctcgtggagcaaggacatctacaactac
atggagccctacgtgagcaagaaccccaggcaggcgtagcgaacta
cagggacatcgacctcggcaggaacgaggtggtcaacgacgtctcca
cctacgccagcggaaggtctggggccagaaatacttcaagggcaac
25 ttcgagaggctcgccattaccaagggcaaggtcgatcctaccgacta
cttcaggaacgagcagagcatcccggcgctcatcaaaaagtactga

30

35

Abbildung 6

YFPPPAAKEDFLGCLVKEIPPRLLYAKSSPAYPSVLGQTIRNSRWSS
5 PDNVKPLYIITPTNVSHIQSAVVCGRRHSVRIRVRSGGHDYEGLSYR
SLQPETFAVVDLNMRAVWVDGKARTAWVDSGAQLGELYAIYKASP
TLAFPAGVCPTIGVGGNFAGGGFGMLLRKYGIAAENVIDVKLVDANG
KLHDKKSMGDDHFWAVRGGGGESFGIVVAWQVKLLPVPPTVTIFKIS
10 KTVSEGAVDIINKWQVVAPQLPADLMIRIIAQGPKATFEAMYLGTCK
TLTPLMSSKFPELGMNPSHCNEMSWIQSIPFVHLGHRDALEDDLNR
NNSFKPFAEYKSDYVYQPFPKTVWEQILNTWLVKPGAGIMIFDPYGA
TISATPESATPFPHRKGVLFNIQYVNYWFAPGAAAAPLSWSKDIYNY
15 MEPYVSKNPRQAYANYRDIDLGRNEVVNDVSTYASGKVWGQKYFKGN
FERLAITKGKVDPTDYFRNEQSIPPLIKKY

20

25

30

35